

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/069228

PCT/JP00/05639

日 本 国 特 許 庁

23.08.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 8月24日

REC'D 13 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第236597号

出 願 人  
Applicant (s):

武田薬品工業株式会社

4

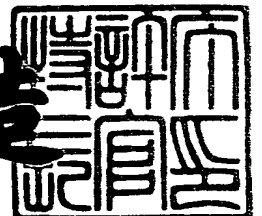
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3078605

【書類名】 特許願

【整理番号】 A99163

【提出日】 平成11年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/52

【発明の名称】 スクリーニング方法

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイツ 1  
4 0 2 号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市板谷 1 丁目 7 1 1 番地の 8 3

【氏名】 細谷 昌樹

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を測定し、

(ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、

(iii) ① 該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該共通構造を有するリガンド候補物質を接触させた場合と該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触させた場合における細胞刺激活性を比較し、および ② 該オーファン受容体タンパク質と該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質との特異的結合量を測定することを特徴とする該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 2】請求項 1 記載のスクリーニング方法によって得られうる化合物またはその塩。

【請求項 3】オーファン受容体タンパク質が G H S 受容体タンパク質である請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】オーファン受容体タンパク質が G H S 受容体タンパク質であり、共通構造を有するリガンド候補物質が C 末端に R F アミド構造を有するペプチドである請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

(i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を

測定し、

(ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、

(iii) 該共通構造を有するリガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質への特異的結合量を測定することにより、該オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプを決定する方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、オーファン受容体タンパク質発現細胞などの活性化を指標として高濃度の試験化合物をスクリーニングし、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を利用して、オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物を効率よくスクリーニングする方法さらには該共通構造を利用して、オーファン受容体タンパク質の（内因性）リガンドを決定する方法などに関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

ホルモンや神経伝達物質など生理活性物質の多くは、細胞表面に存在する受容体分子に結合して作用を発揮し、様々な生命現象の調節を行なっている。これら生理活性物質の作用を補填、増強あるいは阻害する物質を探索することは新規な医薬の研究・開発のための主要な手段の一つとなっているが、その過程において特に、作用点となる受容体分子の性状を理解することが極めて重要である。近年の分子生物学的手法の発達によって多くの生理活性物質の受容体を分子レベルで解析することが可能になった。そのような受容体分子の中には細胞膜を7回貫通する共通の構造的特徴を有する一群のものが知られており、7回膜貫通型受容体と呼ばれている。また、細胞内情報伝達系とGTP結合蛋白質（G蛋白質）を介して共役していることから、これらはG蛋白質共役型受容体とも呼ばれている。7回膜貫通型受容体のリガンドは、蛋白質、ペプチド、アミン、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、エイコサノイド、リン脂質、匂い物質、光など多岐にわたっている。

最近のゲノムあるいはcDNA等の解析技術の進歩によって、受容体をコードする多くの遺伝子が報告されるようになった。これらのうちのあるものは、配列の特徴から7回膜貫通型受容体のファミリーに属することが推定されるものの、対応するリガンドが知られていないことからオーファン受容体と呼ばれている。このようなオーファン受容体のリガンドを同定することができたならば、その受容体およびリガンドが調節している新たな生理機能あるいは病態が明らかになることが期待される。そのため、オーファン受容体のリガンドの探索は新たな医薬品開発のターゲットを発掘する手段として注目されている。これまでにリガンド既知の受容体にある程度顕著な類似性を示すオーファン受容体については、既知のリガンドあるいはその類縁体をリガンドの候補として検討し、実際に内因性のリガンドの同定に至ったorphanin FQ/nociceptin (Meunier, J.-C. Nature 393: 211-212, 1998) のような例もあるが、既知のリガンドあるいはその類縁体の構造上の類似性のみからリガンドの構造を推定するには限界がある。多くの場合はオーファン受容体タンパク質発現細胞のシグナル伝達系の活性化を指標とし、精製によって内因性リガンドの同定が行われている (Sakurai, T. et al. Cell 92: 573-585, 1998; Hinuma, S. et al. Nature 393: 272-276, 1998; Tatamoto, K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251: 471-476, 1998)。しかし、7回膜貫通型受容体を介したシグナル伝達系は単一ではなく、内因性のリガンドに由来する活性を検出するためにはいくつものアッセイ系を並列してスクリーニングする必要があった。また、7回膜貫通型受容体のリガンドは多岐にわたっており、アッセイに供するリガンド候補となるサンプルを合理的に選定することは困難であった。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

効率的でかつ確実なオーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法およびオーファン受容体タンパク質の(内因性)リガンドを決定する方法の確立が課題とされている。



【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、

- (i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に(好ましくは高濃度の)試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を測定し、
- (ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、
- (iii) ① 該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該共通構造を有するリガンド候補物質を接触させた場合と該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触させた場合における細胞刺激活性を比較し、および ② 該オーファン受容体タンパク質と該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質との特異的結合量を測定することによって、オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩を効率的にスクリーニングできることを見出し、さらにこれらの知見に基づいて、検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1)

- (i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を測定し、
- (ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、
- (iii) ① 該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該共通構造を有するリガンド候補物質を接触させた場合と該オーファン受容体タンパ

ク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触させた場合における細胞刺激活性を比較し、および ② 該オーファン受容体タンパク質と該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質との特異的結合量を測定することを特徴とする該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2) 上記 (1) 記載のスクリーニング方法によって得られうる化合物またはその塩、

(3) オーファン受容体タンパク質が G H S 受容体タンパク質である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(4) オーファン受容体タンパク質が G H S 受容体タンパク質であり、共通構造を有するリガンド候補物質が C 末端に R F アミド構造を有するペプチドである上記 (1) 記載のスクリーニング方法、および

(5)

(i) オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を測定し、

(ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、

(iii) 該共通構造を有するリガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質への特異的結合量を測定することにより、該オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプを決定する方法などに関する。

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の形態】

(A) オーファン受容体タンパク質について：

本明細書において「オーファン受容体タンパク質」とは、そのリガンドが知られていないタンパク質のことを意味し、公知のものに加えて未知のものも包含する。

オーファン受容体タンパク質の具体例としては、例えば、後述の実施例 1 で用いられた GHS 受容体タンパク質 (Howard, A.D. et al. Science 273: 974-977, 1996)、FM-3 受容体タンパク質 (Tan, C. P et al, Genomics 52, 223-229) または mas 受容体タンパク質 (Young D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5339-5342, 1988) などの他、Swiss-plot のオーファン受容体のデータベースに記載されているものなどがあげられる。

本発明で用いられるオーファン受容体タンパク質は塩を形成していてもよく、「オーファン受容体タンパク質」の塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるオーファン受容体タンパク質をコードする DNA としては、オーファン受容体タンパク質をコードする DNA を含有する DNA であればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓  $\beta$  細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、辜

丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するcDNA、該組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

#### 【0007】

本発明で用いられるオーファン受容体タンパク質をコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

オーファン受容体タンパク質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、オーファン受容体タンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばオーファン受容体タンパク質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化されたオーファン受容体タンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまた

はTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0008】

(B) オーフアン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分またはオーフアン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分について：

本明細書において、「オーフアン受容体タンパク質発現細胞」とは上記(A)のオーフアン受容体タンパク質を発現した宿主細胞をいう。

オーフアン受容体タンパク質を宿主細胞において発現させる方法としては、例えば、上記(A)のオーフアン受容体タンパク質をコードするDNAを用いて、以下の方法により発現させることができる。

即ち、オーフアン受容体タンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) オーフアン受容体タンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0009】

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が

酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。なお、本発明においては、オーファン受容体タンパク質を介する細胞刺激活性を測定するため、宿主は動物細胞もしくは昆虫細胞であることが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター $\alpha$ （MF $\alpha$ ）・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたオーファン受容体タンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

#### 【0010】

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられるが、上述のとおり、昆虫細胞または動物細胞が好ましく用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0011】

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 [以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞, Vero細胞, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO

(dhfr<sup>-</sup>CHO細胞), マウスL細胞, マウス3T3細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトHEK293細胞, ヒトFL細胞, C127細胞, BALB3T3細胞, Sp-2/O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには, たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには, たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには, たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

#### 【0012】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには, たとえばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6巻, 47-55頁(1988年)などに記載の方法に従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには, たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

オーファン受容体タンパク質発現ベクターの細胞への導入方法としては, 例えば, リポフェクション法 [Felgner, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America), 84巻, 7413頁(1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁(1973年)]、電気穿孔法 [Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 841-845頁(1982年)] 等が挙げられる。

このようにして, オーファン受容体タンパク質発現細胞が得られる。



なお、動物細胞を用いて、オーファン受容体タンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことによりオーファン受容体タンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、*d h f r* 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、*d h f r* 遺伝子とともに、オーファン受容体タンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

#### 【0013】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3-β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行な

い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 77巻, 4505(1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5~8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20℃~35℃ で約 24~72 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0014】

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2~6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃ で約 3~5 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約 5~20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of The American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of The Society for The Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pH は約 6~8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃~40℃ で約 15~60 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特に CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞および dhfr 遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を用いるのが好ましい。

## 【0015】

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したオーファン受容体タンパク質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該オーファン受容体タンパク質を含有する細胞や膜画分中のオーファン受容体タンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのアゴニスト（リガンド）結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分とは上記の宿主細胞として列記した細胞で、オーファン受容体タンパク質を発現しないもののことをいう。またその細胞膜画分としては、上記と同様のものなどが用いられる。

## 【0016】

## (C) 試験化合物について：

本明細書において、「試験化合物」とは、例えば天然・非天然のペプチド、天然・非天然のタンパク質、天然・非天然の非ペプチド性化合物、合成化合物、天然・非天然の発酵生産物などがあげられる。

これら試験化合物に用いられるペプチド、タンパク質、化合物または発酵生産物は塩を形成していてもよく、これらの塩としては、生理学的に許容される塩基

(例えばアルカリ金属など) や酸 (有機酸、無機酸) との塩があげられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩などが好ましい。このような塩としては例えば無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などがあげられる。

【0017】

(D) 細胞刺激活性について：

オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合における、それぞれの細胞刺激活性は、例えば (a) 細胞外 pH の変動、(b) アラキドン酸遊離、(c) アセチルコリン遊離、(d) 細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、(e) 細胞内 cAMP の変動、(f) 細胞内 cGMP の変動、(g) イノシトールリン酸産生、(h) 細胞膜電位変動、(i) 細胞内蛋白質のリン酸化、(j) c-fos の活性化、(k) GTP $\gamma$ S の結合、(l) レポーター遺伝子の発現などを指標にして、公知の方法に準じてまたは市販の測定用キットを用いて測定することができる。

本発明のスクリーニング方法またはリガンド決定方法において行われる細胞刺激活性の測定は、上記のなかでも、細胞外 pH の変動を指標とする測定方法が好ましく用いられる。

具体的には、まず、オーファン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分、およびオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を別々にマルチウェルプレート等に培養する。細胞刺激活性を測定するにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、それぞれの細胞に試験化合物を添加して一定時間インキュベートした後、細胞またはその細胞膜画分を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。

細胞刺激活性の指標とする物質の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよ

い。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞またはその細胞膜画分に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なオーファン受容体タンパク質を発現した細胞またはその細胞膜画分およびオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分が必要である。形質転換体であるオーファン受容体タンパク質発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。

また、細胞刺激活性を測定するためには、微弱なアゴニスト活性も検出できるように、細胞の特異的な反応を識別できる範囲で可能な限り高濃度で細胞刺激活性を測定することが好ましい。この場合の高濃度とは、通常 $10^{-8}\text{M}$ ～ $1\text{M}$ 、好ましくは $10^{-6}\text{M}$ ～ $10^{-2}\text{M}$ のことを言う。試験化合物としては、上記(C)に記載のものと同様のものなどがあげられる。

#### 【0018】

上記の細胞刺激活性測定系について、以下にさらに具体的に記載する。

(1) 細胞外pH (acidification rate) の変動を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系

オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分がアゴニスト活性を有する試験化合物に反応して変化する細胞外のpHをサイトセンサー (Cytosensor) 装置 (モレキュラーデバイス社など) を使用して測定することによって、細胞刺激活性を測定することができる。サイトセンサー装置を利用した、細胞外pH変化の測定をすることによる試験化合物の細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

① オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分を約2時間～約48時間、好ましくは約5時間～約24時間 (例えば、サイトセンサー装置用のカプセル内などで) 培養した後、培地のpHを安定させる。

培地のpHが安定するまでは、例えば、0.1%ウシ血清アルブミンを含むRPMI1640培地 (モレキュラーデバイス社製) などを灌流させるのが好ましい。

② 次に、試験化合物をオーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜

画分に発現したオーファン受容体タンパク質に試験化合物を接触させる。

接触させる方法としては、試験化合物を含む培地をオーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に灌流する方法が一般的である。

③ 次に、試験化合物を含む培地をオーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に発現したオーファン受容体タンパク質に接触させることによって生じる培地のpH変化を測定する。

④ 上記①～③の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いて実施する。

#### 【 0 0 1 9 】

(2) G T P  $\gamma$  Sの放射活性を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系

オーファン受容体タンパク質発現細胞がアゴニスト活性を有する試験化合物によって刺激されると細胞内のGタンパクが活性化されてG T Pが結合する。この現象はオーファン受容体タンパク質発現細胞の膜画分においても観察される。通常、G T Pは加水分解されてG D Pへと変化するが、このとき反応液中にG T P  $\gamma$  Sを添加しておくるとG T P  $\gamma$  SはG T Pと同様にGタンパクに結合するが、加水分解されずにGタンパクを含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したG T P  $\gamma$  Sを用いると細胞膜に残存した放射活性を測定することによって試験化合物の受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。この反応を利用して試験化合物のオーファン受容体タンパク質発現細胞およびオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞に対する刺激活性を測定・比較することができる。この方法は、オーファン受容体タンパク質およびオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞を含む膜画分を用いるアッセイ法であるが、細胞刺激活性を測定するものであり、本測定法においてオーファン受容体タンパク質膜画分へのG T P  $\gamma$  S結合促進活性を示し、オーファン受容体タンパク質を発現しない膜画分へのG T P  $\gamma$  S結合促進活性を示さない物質はリガンド候補物質である。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

① オーファン受容体タンパク質を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（例えば、50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1  $\mu$ M GDP, 0.1% BSA pH 7.4など）で希釈する。

希釈率は、受容体タンパク質の発現量により異なる。

- ② 次に①で得られた液を適当な容器（例えば、Falcon2053など）に分注し、試験化合物を加え、さらに終濃度が約200 pMとなるように [ $^{35}$ S] GTP  $\gamma$  Sを加える。
- ③ 次に、②で得られた培地を約25℃で約1時間保温した後、洗浄用緩衝液（例えば、氷冷した50 mM Tris, 5 mM  $MgCl_2$ , 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS pH 7.4 1.5mlなど）を加えて、（例えば、ガラス繊維ろ紙GF/Fなどを用いて）でろ過する。
- ④ ろ紙を保温（例えば、約65℃、約30分）して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した [ $^{35}$ S] GTP  $\gamma$  Sの放射活性を測定する。
- ⑤ 上記①～④の方法をオーファン受容体タンパク質を含まない細胞膜画分を用いて実施する。

#### 【0020】

（3）細胞内cAMPの変動を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系

オーファン受容体タンパク質発現細胞はアゴニスト活性を有する試験化合物のアゴニスト刺激によって細胞内cAMP量に変動する。この反応を利用して試験化合物のオーファン受容体タンパク質発現細胞に対する細胞刺激活性を測定することができる。

オーファン受容体タンパク質を発現させた種々の動物細胞のcAMP産生量はマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と $^{125}$ I標識cAMP（ともに市販品）を使用することによってRIAあるいは抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせた他のEIA系でも測定することができる。また抗cAMP抗体をprotein Aあるいは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと $^{125}$ I標識cAMPとを使用するSPA法による定量も可能である（例えば、アマシャムファルマシアバイオテック製のキットを使用する）。

本測定系において、cAMP産生の促進活性を測定することができる。あるいは、フォルスコリンなど細胞内cAMP量を増加させるような物質によって細胞内cAMP量を上昇させ、試験化合物を添加することによって細胞内cAMP量に変化すること

を観察することにより、細胞刺激活性（cAMP産生抑制活性）を測定することができる。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

- ① オーフアン受容体タンパク質を発現させた動物細胞（例えばCHO細胞など）を24穴プレートに適当な濃度（例えば $5 \times 10^4$  cell/well）で播種し、約48時間培養する。
- ② 次に、オーファン受容体タンパク質を発現させた動物細胞を緩衝液（例えば、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）（以下、0.2mM 3-イソブチル-メチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）を、反応用バッファーと呼ぶ）で洗浄する。
- ③ その後適当量（例えば、約0.5ml）の反応用バッファーを細胞に加えて、約30分間培養器で保温する。
- ④ 次に、反応用バッファーを除き、新たに適当量（例えば、約0.25ml）の反応用バッファーを細胞に加えた後、適当量（例えば、約0.25ml）の反応用バッファー（cAMP産生抑制活性を測定する場合には、2 $\mu$ Mフォルスコリンを含むものが好ましい）に適当量（例えば、約1 nM）の試験化合物を添加したものを細胞に加え、約37℃で約24分間反応させる。
- ⑤ 次に、適当量（例えば、約100 $\mu$ l）の20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で約1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出する。
- ⑥ 抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテク）などを用いて測定する。
- ⑦ 上記①～⑥の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞を用いて実施する。

#### 【0021】

（4）CRE-レポーター遺伝子を導入することを特徴とする細胞刺激活性測定系  
 CRE（cAMP response element）を含むDNAを、ピッカジーン ベイシックベクターまたはピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などのルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、これをCR



E-レポーター遺伝子ベクターとする。

CRE-レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、cAMP上昇を伴う刺激は、CREを介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のcAMP量の変動を検出することができる。

CRE-レポーター遺伝子ベクターをオーファン受容体タンパク質発現細胞にトランスフェクションした細胞を利用して、細胞刺激活性を測定することができる。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

- ① CRE-レポーター遺伝子を導入したオーファン受容体タンパク質発現細胞を24穴プレートに適当な濃度（例えば、 $5 \times 10^3$  cell/well）で播種し、約48時間培養する。
- ② 細胞を適当量（例えば、0.2mM）の緩衝液（例えば、3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）を、反応用バッファーと呼ぶ）で洗浄する。
- ③ その後、適当量（例えば、0.5ml）の反応用バッファーを細胞に加えて約30分間培養器で保温する。
- ④ 次に、反応用バッファーを除き、新たに適当量（例えば、0.25ml）の反応用バッファーを細胞に加えた後、適当量（例えば、1 nM）の試験化合物と適当量（例えば、0.25ml）の反応用バッファー（cAMP産生抑制活性を測定する場合には、2μMフォルスコリンを含むものが好ましい）を細胞に加え、約37℃で約24時間反応させる。
- ⑤ 細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））などで溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。
- ⑥ ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターなどにより測定する。
- ⑦ 上記①～⑥の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはそ

の細胞膜画分を用いて実施する。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼあるいは $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。即ち、アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530によって、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) 活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEによって測定することができる。

#### 【0022】

#### (5) アラキドン酸遊離を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系

オーファン受容体タンパク質発現細胞はアゴニストによる刺激の結果アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。あらかじめ、放射活性を有するアラキドン酸を細胞に取り込ませておくことによって、この活性を細胞外に放出された放射活性を測定することによって細胞刺激活性を測定することができる。このとき、試験化合物を添加して、試験化合物のアラキドン酸代謝物放出活性を調べることにより、細胞刺激活性を測定することができる。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

- ① オーファン受容体タンパク質発現細胞（例えば、オーファン受容体タンパク質発現CHO細胞など）を24穴プレートに適当な濃度（例えば、 $5 \times 10^4$  cell/well）で播種し、24時間培養する。
- ② 培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を適当量（例えば、 $0.25 \mu\text{Ci/well}$ ）となるよう添加する。 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸添加約16時間後、細胞を洗浄液（例えば、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハंकスバッファー(pH7.4)）で洗浄し、各wellに緩衝液（例えば、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハंकスバッファー(pH7.4)：以降、0.05% BSAと20mM HEPESを含むハंकスバッファー(pH7.4)を反応用バッファーと呼ぶ。）に溶解した試験化合物を添加する。
- ③ 約37℃で約60分間インキュベートした後に、反応用バッファーを適当量（例

例えば、400  $\mu$ l) シンチレーターに加え、反応液中に遊離した [ $^3$ H] アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

④ 上記①～③の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞を用いて実施する。

### 【0023】

(6) 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の遊離を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系

オーファン受容体タンパク質発現細胞をアゴニスト活性を有する試験化合物によって刺激することによって細胞内のCa濃度が上昇する。これを利用することによって細胞刺激活性を測定することができる。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

① オーファン受容体タンパク質発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーグラス上に播き、約2日後、培養液を適当量（例えば、4 mM）の Fura-2 AM（同仁化学研究所）を懸濁したHBSSに置換し、室温で約2時間30分おく。

② HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーグラスをセットし、蛍光測定器で、試験化合物を加えたときの励起波長340nm及び380nmでの505nmの蛍光強度の比の上昇を測定する。

また、以下のようにFLIPR（モレキュラーデバイス社製）を使うこともできる。  
すなわち、① 細胞懸濁液にFluo-3 AM（同仁化学研究所製）を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。

② FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に試験化合物を加え、試験化合物の添加によって観測される蛍光強度が変化することを測定する。

オーファン受容体タンパク質発現細胞にaequorinなどのように細胞内Caイオンの上昇によって発光するようなタンパクの遺伝子を共発現させておき、細胞内Caイオン濃度の上昇によってaequorinがCa結合型となり発光することを利用して、試験化合物の添加によって観測される発光強度が変化することを測定することにより、細胞刺激活性を測定することも可能である。この場合の方法は、蛍光物質を取り込ませないこと以外は上記と同様である。

また、細胞内Caイオン濃度の変動を測定し易くするために、キメラGタンパク

質などの改変型Gタンパク質を同時に発現させた細胞を使用することもできる。該キメラGタンパク質とは、Gi、Go、GsなどCa<sup>2+</sup>をシグナル伝達系として使用しないGタンパク質をG<sub>4</sub>、G<sub>11</sub>などのCa<sup>2+</sup>をシグナル伝達系として使用するGタンパク質の機能ドメインで置換したGタンパク質のことをいう。該キメラタンパク質を使用することによって、あらゆるGタンパク質のシグナル伝達系をCa<sup>2+</sup>の変動でモニターすることができる。

③ 上記①～②の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞を用いて実施する。

#### 【0024】

(7) イノシトールリン酸産生を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系  
オーファン受容体タンパク質発現細胞にアゴニスト活性を有する試験化合物を添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度が上昇する。試験化合物によって生じるオーファン受容体タンパク質発現細胞におけるこの反応を観察することにより細胞刺激活性の測定を行なうことができる。

本方法により細胞刺激活性を測定する具体的な方法を以下に記す。

① 24穴プレートに播いて1日目のオーファン受容体タンパク質発現細胞にmyo-[2-<sup>3</sup>H] inositol (2.5マイクロCi/well)を添加した培地中で1日培養したオーファン受容体タンパク質発現細胞を、よく洗浄後、試験化合物を添加し10%過塩素酸を加え反応を止める。

② 適当量(例えば、1.5 M)のKOH、適当量(例えば、60mM)のHEPES溶液で中和し、AG1x8樹脂(Bio-Rad)を詰めたカラムに通し、洗浄した後、適当量(例えば、1 M)HCOONH<sub>4</sub> および適当量(例えば、0.1M) HCOOHで溶出した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

③ 上記①～②の方法をオーファン受容体タンパク質を発現しない細胞を用いて実施する。

#### 【0025】

(E) アゴニスト活性を有する試験化合物について：

本明細書において、「アゴニスト活性を有する試験化合物」とは、上記(C)に記載の試験化合物(例えば天然・非天然のペプチド、天然・非天然のタンパク

質、天然・非天然の非ペプチド性化合物、合成化合物、天然・非天然の発酵生産物など）のうち、上記（D）に記載の細胞刺激活性測定系のいずれか（好ましくは、細胞外 pH（acidification rate）の変動を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系など）によりオーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分を用いた場合に細胞刺激活性が認められ、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物（例えば天然・非天然のペプチド、天然・非天然のタンパク質、天然・非天然の非ペプチド性化合物、合成化合物、天然・非天然の発酵生産物など）のことをいう。

より具体的には、例えば、オーファン受容体タンパク質が GHS 受容体（Howard, A.D. et al. Science 273: 974-977, 1996）の場合のアゴニスト活性を有する試験化合物としては、C末端に RF アミド構造を有するペプチド、より具体的には、配列番号：1、6、9～10、13、16～20 で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。これらアゴニスト活性を有する試験化合物であるペプチド、タンパク質、化合物または発酵生産物も塩を形成していてもよく、これらの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩があげられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩などが好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などがあげられる。

上記（D）に記載の細胞刺激活性測定系において、試験化合物がアゴニスト活性を有する試験化合物であるか否かの判断基準の具体例を以下に示すが、下記の判断基準はあくまでも例示であって、試験化合物がアゴニスト活性を有するか否かが下記の基準によって限定的に解釈されるものではない。

#### 【0026】

上記（D）-（1）に記載の細胞外 pH（acidification rate）の変動を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、試験化合物を細胞

に接触させる前の細胞外 pH を 100% とした場合に、試験化合物を細胞に接触させたときの反応のピーク時の細胞外 pH が 105% を越えるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物についてはアゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (2) に記載の標識した GTP  $\gamma$  S の放射活性を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、試験化合物を加えなかった実験区の放射活性を 100% とし、試験化合物を加えた実験区の放射活性が 105% を越えるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物についてはアゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (3) に記載の細胞内 cAMP の変動を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、cAMP の産生抑制作用を指標にする場合には、フォルスコリン刺激によって産生された cAMP 量を 100% とし、試験化合物の添加によって産生された cAMP 量が 95% 以下であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。一方、cAMP の産生促進作用を指標にする場合には、試験化合物を添加しない場合の cAMP 量を 100% とし、試験化合物の添加によって産生された cAMP 量が 105% 以上であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (4) に記載の CRE-レポーター遺伝子を導入することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合、cAMP の産生抑制作用を指標にする場合には、フォルスコリン刺激によって生じた発光量を 100% とし、試験化合物の添加によって生じた発光量が 95% 以下であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。一方、cAMP の産生促進作用を指標にする場合には、試験化合物を添加しな

い場合の発光量を100%とし、試験化合物の添加によって産生された発光量が105%以上であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (5) に記載のアラキドン酸遊離を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、試験化合物非添加反応バッファーによる培地中の [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸代謝物の量を100%とし、試験化合物を添加したときの培地中の [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸代謝物の量が105%以上であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (6) に記載の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の遊離を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、試験化合物を添加しない場合に観測される蛍光強度を100%とし、試験化合物を添加したときの蛍光強度が105%以上であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

上記 (D) - (7) に記載のイノシトールリン酸産生を測定することを特徴とする細胞刺激活性測定系を用いた場合には、試験化合物非添加反応バッファーによる培地中の放射活性を100%とし、試験化合物を添加したときの培地中の放射活性が105%以上であるもので、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分を用いた場合には細胞刺激活性が認められない試験化合物については、アゴニスト活性を有する試験化合物として選定する。

【0 0 2 7】

(F) アゴニスト活性を有する試験化合物の構造比較について：

上記 (E) により、アゴニスト活性を有する試験化合物を選定した後、各アゴニスト活性を有する試験化合物の構造を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、該共通構造を有するリガンド候補物質を作成または取得する。

該リガンド候補物質とは、該アゴニスト活性を有する試験化合物に共通の構造を有し、各試験化合物に比し、上記（D）の細胞刺激活性が強い物質（例えば天然のペプチド、天然のタンパク質、天然の非ペプチド性化合物など）のことをいう。

アゴニスト活性を有する試験化合物が天然・非天然のペプチド、天然・非天然のタンパク質などの場合には、それらのペプチドまたはタンパク質をコードするアミノ酸配列を比較し、それらの相同性の高い部分配列、あるいは類似した立体構造を有する部分が共通構造といえる。

具体的には、例えば、オーファン受容体タンパク質がGHS受容体（Howard, A.D. et al. Science 273: 974-977, 1996）である場合の共通構造としては、配列番号：1、6、9～10、13、16～20で表されるアミノ酸配列を比較すれば、「C末端にRFアミド構造を有する」という共通構造が導き出せる。該共通構造から、本発明のスクリーニング方法またはリガンド決定方法において、オーファン受容体タンパク質がGHS受容体である場合、共通構造を有するリガンド候補物質、ひいてはGHS受容体の（内因性）リガンドはそのC末端にRFアミド構造を有するペプチドであると考えられる。

C末端にRFアミド構造を有するペプチドとしては、哺乳類ではA-18-F-NH<sub>2</sub>、F-8-F-NH<sub>2</sub>（Perry, S. J. et al. FEBS Lett. 409: 426-430, 1997）、prolactin-releasing peptide（Hinuma, S. et al. Nature 393: 272-276, 1998）などが知られている。また、下等動物では一群のRFアミドペプチドファミリーとして普遍的に存在している。更に哺乳類についても未知のRFアミドペプチドが下等動物と同様に多様に存在すると考えられ、哺乳類における新規なRFアミドペプチドの中にGHS受容体の（内因性）リガンドが存在すると考えられる。

アゴニスト活性を有する試験化合物が、天然・非天然の非ペプチド性化合物、合成化合物などの場合には、それらの化合物の化学構造を比較し、共通性のある基本骨格（例えば、特定の環構造、例、「脂環式炭化水素」としてのシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルカンジエニルなどの飽和又は不飽和の脂環式炭化水素、「複素環」としての芳香族複素環、飽和あるいは不飽和の非芳香族複素環（脂肪族複素環）等）が共通構造といえる。



また、本発明のリガンドの決定方法は、上記の共通構造を指標として、リガンドを決定するため、リガンドと構造上の類似性が高いリガンドのサブタイプを取得すること、従来法に比べ、格段に容易かつ確実となる。

#### 【0028】

(G) アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造の決定以降の工程について：

以下に上記(F)により決定された共通構造を有するリガンド候補物質の作成または取得方法について具体的に説明する。

(1) 共通構造を有する天然のペプチド、天然のタンパク質、天然の非ペプチド性化合物を検索して、共通構造を有するリガンド候補物質を選定したのち、該共通構造を有するリガンド候補物質を作成または取得する方法。

上記(F)に記載の試験化合物の共通構造をもとに、共通構造を有する天然のペプチド、天然のタンパク質、天然の非ペプチド性化合物を検索することによりリガンドまたはそのサブタイプを推定することができる。

利用できる公知のデータベースなどは種々存在するが、代表的なものをあげれば、例えば、Beilstein Handbook of Organic Chemistry (Beilstein社)、CROP R (Serwent Crop Protection Registry) ファイル (Derwent社)、Derwent Drug ファイル (Derwent社)、The Merck Index (Merck社) などがあげられる。

次に、推定されたリガンドについて上記(D)に記載の細胞刺激活性測定系を用いて、細胞刺激活性を測定し、リガンド候補物質との細胞刺激活性と比較することにより、リガンドまたはそのサブタイプであるか否かを決定することができる。

#### 【0029】

(2) (アゴニスト活性を有する試験化合物が、ペプチド、タンパク質またはそれらの塩である場合に) 共通構造をコードする塩基配列を含有するプライマーまたはプローブを作成して、リガンドまたはそのサブタイプをコードする cDNA または遺伝子をクローニングすることによりリガンド候補物質を取得する方法。

まず、上記(F)に記載のアゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造、即

ちアゴニスト活性を有する試験化合物をコードするアミノ酸配列間の相同性の高い配列部分をコードする塩基配列を含有するプライマーまたはプローブを作成する。

次に、該プライマーを用いて、自体公知のPCR法によって、ヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）および魚類などのあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞由来のゲノムDNAライブラリー、cDNAライブラリーなどから目的とするリガンド候補物質をコードするDNAを増幅する。

クローン化されたりリガンド候補物質をコードする塩基配列を含有するcDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

次に、上記(A)および(B)に記載したオーファン受容体タンパク質発現細胞の製造方法に準じて、リガンド候補物質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養し、該培養物から例えば下記の方法により、リガンド候補物質を分離精製することができる。

すなわち、培養後、自体公知の方法で、菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により推定されるリガンドまたはそのサブタイプの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニンなどのタンパク変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるリガンド候補物質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるリガンド候補物質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

また、リガンド候補物質をコードするアミノ酸配列から、自体公知のタンパク質の合成法に従って、あるいはリガンド候補物質を含有するタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。タンパク質の合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、リガンド候補物質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のリガンド候補物質を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuecke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてリガンド候補物質を精製単離することができる。上記方法で得られるリガンド候補物質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩

で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

リガンド候補物質について上記 (D) に記載の細胞刺激活性測定系を用いて、細胞刺激活性を測定し、試験化合物との細胞刺激活性と比較することにより、アゴニスト (リガンド) 活性の有無を確認することができる。アゴニスト (リガンド) 活性が認められたリガンド候補物質が、オーファン受容体タンパク質の (内因性) リガンドまたはそのサブタイプであるか否かは、下記 (J) に記載のリガンド決定方法により確認することができる。

また、ジーントラッパーのように上記プローブを使って目的の遺伝子の mRNA を精製し、その mRNA からリガンド候補物質の cDNA を取得することもできる。さらに上記 (A) に記載したオーファン受容体タンパク質の製造方法に準じて、リガンド候補物質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによってリガンド候補物質を得ることができる。

#### 【0030】

(3) (アゴニスト活性を有する試験化合物が、ペプチド、タンパク質またはそれらの塩である場合に) 共通構造を有するペプチドまたはタンパク質を配列データベースを検索することによりリガンド候補物質を探索する方法。

上記 (F) に記載のアゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造、即ちアゴニスト活性を有する試験化合物をコードするアミノ酸配列間の相同性の高い配列部分をコードする塩基配列を含有するペプチドまたはタンパク質を配列データベースを検索して、リガンド候補物質を決定することができる。

配列データベースとしては、例えば、GenBank (登録商標) ファイル (National Institute of Health)、VTS (Virtual Transcribed Sequence) などがあげられる。

リガンド候補物質をコードする塩基配列が決定されれば、上記 (G) - 2 に記載の方法に準じて、リガンド候補物質を取得することが可能である。

また、データベースでの検索の結果、リガンド候補物質の一部をコードすると推定される配列が判明した場合には、該配列をもとにプライマーまたはプローブを作成して、上記 (G) - 2 に記載の方法に準じて、リガンド候補物質を取得することが可能である。

【 0 0 3 1 】

(5) 共通構造を認識する抗体を作成することによりリガンド候補物質を探索する方法。

上記 (F) に記載のアゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造、即ちアゴニスト活性を有する試験化合物をコードするアミノ酸配列間の相同性の高い配列部分で表されるペプチドを上記のペプチド (タンパク質) 合成方法を用いて、作成する。

次に該ペプチドに対する抗体を下記の方法に従って作成する。なお、抗体は該ペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

該ペプチドに対する抗体は、該ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

該ペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計 2 ～ 1 0 回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2 ～ 5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) や

センダイウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

#### 【0032】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ペプチド抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【 0 0 3 3 】

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテイン A あるいはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【 0 0 3 4 】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

上記ペプチド抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアペプチドとの複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物からペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアーペプチドの種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ～ 2 0、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 1 0 回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、

好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

かくして得られるアゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を認識する抗体の交差反応性を利用して、リガンド候補物質を検出し、その免疫活性を指標として各種抽出法、クロマトグラフィーを組み合わせることによって、リガンド候補物質を得ることができる。

#### 【0035】

(H) オーフアン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法について：

上記(G)において取得されたりガンド候補物質を用いて、オーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物(高活性アゴニスト)またはその機能を阻害する化合物(アンタゴニスト)をスクリーニングすることが可能である。

オーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物を「高活性アゴニスト」と記載するが、「高活性」とは、上記(E)に記載の「アゴニスト活性を有する試験化合物」に比べて、より細胞刺激活性(具体的には、上記(D)に記載の細胞刺激活性など)などが強いことを意味する。

以下にそのスクリーニング方法を詳述する。

オーファン受容体タンパク質を用いるか、または組換え型オーファン受容体タンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、上記(G)において取得されたりガンド候補物質とオーファン受容体タンパク質との結合性を変化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

すなわち、

まず、オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分にリガンド候補物質を接触させた場合と該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその



細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触された場合における上記 (D) に記載した (a) 細胞外 pH の変動、(b) アラキドン酸遊離、(c) アセチルコリン遊離、(d) 細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、(e) 細胞内 cAMP の変動、(f) 細胞内 cGMP の変動、(g) イノシトールリン酸産生、(h) 細胞膜電位変動、(i) 細胞内蛋白質のリン酸化、(j) c-fos の活性化、(k) GTP $\gamma$ S の結合、(l) レポーター遺伝子の発現などを指標とした細胞刺激活性を比較する。

オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分にリガンド候補物質を接触させた場合の細胞刺激活性に比し、該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触された場合の細胞刺激活性が強い場合には、該候補物質は、該オーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物（いわゆるアゴニスト）である可能性が高い。

該候補物質が該オーファン受容体タンパク質の機能を（選択的に、Specificに）促進する化合物（いわゆるアゴニスト）であるか否かは、該オーファン受容体タンパク質と該候補物質との特異的結合量を測定すればよい。

特異的結合量の測定方法としては、例えば、標識した候補物質をオーファン受容体タンパク質に接触させた場合における、標識した候補物質の該オーファン受容体タンパク質に対する結合量を測定する方法などがあげられる。測定結果、十分な結合量（非特異結合に対して 1 % 以上の結合量の増加、好ましくは 10 % 以上の結合量の増加）が認められれば、該候補物質は該オーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物（いわゆるアゴニスト）と認められる。

該測定方法の具体的な説明を以下にする。

まず、該測定方法に用いるオーファン受容体タンパク質としては、前記したオーファン受容体タンパク質を含有するものであれば何れのものであってもよい。スクリーニングに用いる大量のオーファン受容体タンパク質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたオーファン受容体タンパク質などが適している。

オーファン受容体タンパク質を製造するには、前述の方法が用いられるが、オーファン受容体タンパク質をコードする DNA を前出の動物細胞や昆虫細胞で発

現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。オーファン受容体タンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、上記測定方法において、オーファン受容体タンパク質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したオーファン受容体タンパク質であってもよいし、オーファン受容体タンパク質を含有する細胞を用いてもよく、またオーファン受容体タンパク質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

オーファン受容体タンパク質を含有する細胞としては、該受容体タンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を

膜画分とする。該膜画分中には、発現したオーファン受容体タンパク質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該オーファン受容体タンパク質を含有する細胞や膜画分中のオーファン受容体タンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。

標識した候補物質としては、例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識された候補物質などが用いられる。

該測定方法を行なうには、まずオーファン受容体タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（望ましくはpH 6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの候補物質とレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識した候補物質を添加する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。

一方、オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分にリガンド候補物質を接触させた場合の細胞刺激活性に比べ、該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触させた場合の細胞刺激活性が弱いまたは認められない場合には、該候補物質は、該オーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物（いわゆるアンタゴニスト）である可能性がある。

また、オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分にリガンド候補物質を接触させた場合の細胞刺激活性に比べ、該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質およびリガンド候補物質を接触させた場合の細胞刺激活性が弱いまたは認められない場合には、該候補物質は、該オーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物（いわゆるアンタゴニスト）である可能性がある。

該候補物質が該オーファン受容体タンパク質の機能を（選択的に、Specificに）阻害する化合物（いわゆるアゴニスト）であるか否かは、該オーファン受容体タンパク質との特異的結合量を測定すればよい。

特異的結合量の測定方法としては、例えば、標識した候補物質をオーファン受容体タンパク質に接触させた場合における、標識した候補物質の該オーファン受容体タンパク質に対する結合量を測定する方法などがあげられる。測定結果、十分な結合量（非特異結合に対して 1 % 以上の結合量の増加、好ましくは 1 0 % 以上の結合量の増加）が認められれば、該候補物質は該オーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物（いわゆるアンタゴニスト）と認められる。

該測定方法としては、上記のオーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物（いわゆる高活性アゴニスト）をスクリーニングする際の測定方法と同様の方法などが用いられる。

また、標識したリガンド候補物質を、オーファン受容体タンパク質に接触させた場合と、標識したリガンド候補物質およびオーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物の候補物質をオーファン受容体タンパク質に接触させた場合における、標識したリガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質に対する結合量を測定し、

比較することにより、オーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物をスクリーニングすることも可能である。

該スクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるオーファン受容体タンパク質としては、前記したオーファン受容体タンパク質を含有するものであれば何れのもの

であってもよい。スクリーニングに用いる大量のオーファン受容体タンパク質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたオーファン受容体タンパク質などが適している。

オーファン受容体タンパク質を製造するには、前述の方法が用いられるが、オーファン受容体タンパク質をコードするDNAを前出の動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。オーファン受容体タンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、上記スクリーニング方法において、オーファン受容体タンパク質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したオーファン受容体タンパク質であってもよいし、オーファン受容体タンパク質を含有する細胞を用いてもよく、またオーファン受容体タンパク質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

オーファン受容体タンパク質含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン

(Kinematica社製)のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したオーファン受容体タンパク質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該オーファン受容体タンパク質を含有する細胞や膜画分中のオーファン受容体タンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンド候補物質とオーファン受容体タンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする方法を実施するためには、例えば、適当なオーファン受容体タンパク質画分と、標識したリガンドまたはそのサブタイプが必要である。

標識したリガンド候補物質としては、例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりリガンド候補物質などが用いられる。

具体的には、オーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物のスクリーニングを行なうには、まずオーファン受容体タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10ml

の該レセプター溶液に、一定量（5000 c p m～500000 c p m）の標識したリガンド候補物質を添加し、同時に $10^{-4}\text{M}$ ～ $10^{-10}\text{M}$ のオーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物の候補物質を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンド候補物質を加えた反応チューブも用意する。反応は約 $0^{\circ}\text{C}$ から $50^{\circ}\text{C}$ 、望ましくは約 $4^{\circ}\text{C}$ から $37^{\circ}\text{C}$ で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になるオーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物の候補物質をオーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物（いわゆるアンタゴニスト）として選択することができる。

#### 【0036】

（I）上記（H）に記載のオーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質、オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物について：

オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質としては、

天然・非天然のペプチド、天然・非天然のタンパク質、天然・非天然の非ペプチド性化合物、合成化合物、天然・非天然の発酵生産物などから選ばれる。

オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物としては、上記（H）に記載のスクリーニング方法において、オーファン受容体タンパク質の機能を促進する化合物またはオーファン受容体タンパク質の機能を阻害する化合物と認められる化合物のことを意味し、該化合物は塩を形成していてもよい。

該化合物の塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩があげられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩などが好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、

プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などがあげられる。

また、上記（H）の方法で得られうるオーファン受容体タンパク質の機能を促進（高活性アゴニスト）または阻害（アンタゴニスト）する化合物は、後述の（内因性）リガンドまたはそのサブタイプが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

オーファン受容体タンパク質に対するアンタゴニストは、オーファン受容体タンパク質に対するリガンドまたはそのサブタイプが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

オーファン受容体タンパク質に対する高活性アゴニストは、オーファン受容体タンパク質に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明の方法を用いて得られうるアンタゴニスト、高活性アゴニストを医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って投与することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該リガンドまたはそのサブタイプ、およびアンタゴニスト、アゴニストの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg



程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0038】

(J) オーフアン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプの決定方法について：

本発明は、上記(H)に記載のオーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供するのみならず、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を指標として、該オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプをより効率的に、確実に決定する方法をも提供する。

即ち、

- (i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させ、該オーファン受容体タンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、
- (ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、
- (iii) 該共通構造を有するリガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質への特異的結合量を測定することにより、該オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプを決定する方法を提供するものである。

該決定方法中、(i) オーフアン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させ、該オーファン受容体タンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、

- (ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定する工程に関しては、上記と同様の方法が用いられる。

次に、該共通構造を有するリガンド候補物質(上述)を用いて、該リガンド候補物質が、(内因性)のリガンドまたはそのサブタイプであるかを決定する方法を以下に詳述する。

上記リガンド候補物質がオーファン受容体タンパク質のSpecificなリガンドであるか否かは、リガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質への特異的結

合量を測定することにより決定することができる。

すなわち、標識したリガンド候補物質をオーファン受容体タンパク質に接触させた場合における、標識したリガンド候補物質の該オーファン受容体タンパク質に対する結合量を測定する方法などがあげられる。測定結果、十分な結合量（非特異結合に対して1%以上の結合量の増加、好ましくは10%以上の結合量の増加）が認められれば、該候補物質は該オーファン受容体タンパク質の（内因性）リガンドであると認められる。

逆に十分な結合量が認められない場合には、該リガンド候補物質は細胞刺激活性を有するものの、該オーファン受容体タンパク質に対する特異的な結合能が低い物質、即ち、ノンスペシフィックなアゴニスト様物質である可能性が高い。

該決定方法の具体的な説明を以下にする。

まず、該決定方法に用いるオーファン受容体タンパク質としては、前記したオーファン受容体タンパク質を含有するものであれば何れのものであってもよい。スクリーニングに用いる大量のオーファン受容体タンパク質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたオーファン受容体タンパク質などが適している。

オーファン受容体タンパク質を製造するには、前述の方法が用いられるが、オーファン受容体タンパク質をコードするDNAを前出の動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。オーファン受容体タンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992年]に記載の方法に従って

行なうことができる。

したがって、上記測定方法において、オーファン受容体タンパク質を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したオーファン受容体タンパク質であってもよいし、オーファン受容体タンパク質を含有する細胞を用いてもよく、またオーファン受容体タンパク質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

オーファン受容体タンパク質を含有する細胞としては、該受容体タンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したオーファン受容体タンパク質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該オーファン受容体タンパク質を含有する細胞や膜画分中のオーファン受容体タンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。

標識したリガンド候補物質としては、例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンド候補物質などが用いられる。

該測定方法を行なうには、まずオーファン受容体タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの候補物質とレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また

、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識した候補物質を添加する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。

## 【0039】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸

ATP : アデノシン三リン酸  
 EDTA : エチレンジアミン四酢酸  
 SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

【 0 0 4 0 】

G l y : グリシン  
 A l a : アラニン  
 V a l : バリン  
 L e u : ロイシン  
 I l e : イソロイシン  
 S e r : セリン  
 T h r : スレオニン  
 C y s : システイン  
 M e t : メチオニン  
 G l u : グルタミン酸  
 A s p : アスパラギン酸  
 L y s : リジン  
 A r g : アルギニン  
 H i s : ヒスチジン  
 P h e : フェニルアラニン  
 T y r : チロシン  
 T r p : トリプトファン  
 P r o : プロリン  
 A s n : アスパラギン  
 G l n : グルタミン  
 p G l u : ピログルタミン酸  
 H E P E S : N-[2-ヒドロキシエチル] ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]  
 H B S S : Hank's Balanced Salt Solution

【 0 0 4 1 】

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号： 1〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 2〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 3〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 4〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 5〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 6〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 7〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 8〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号： 9〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表 1 及び表 2 参照）。

〔配列番号：10〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：11〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：12〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：13〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：14〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：15〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：16〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：17〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：18〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び表2参照）。

〔配列番号：19〕

後述の実施例2で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す（表1及び

表 2 参照)。

〔配列番号：2 0〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 1〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 2〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 3〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 4〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 5〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 6〕

後述の実施例 2 で用いられたサンプルが有するアミノ酸配列を示す (表 1 及び表 2 参照)。

〔配列番号：2 7〕

後述の実施例 1 で用いられた GHCF をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：2 8〕

後述の実施例 1 で用いられた GHR をコードする DNA の塩基配列を示す。

【0 0 4 2】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範



囲を限定するものではない。

#### 実施例 1 GHS 受容体発現 CHO 細胞の作成

ラット型 GHS 受容体 (growth hormone secretagogue receptor) の取得は以下のように行った。Molecular Endocrinology, 11 (4)、415-423 (1997) に報告されているラット型 GHS 受容体 type 1A の配列に基づき以下の 2 種類の合成 DNA を合成した。

GHCF: 5'-GTCGACCATGTGGAACGCGACCCCCAGCGAGGAG-3' (配列番号: 27)

GHR: 5'-GCTAGCGGAGAGATGGGATGTGCTGTCATGT-3' (配列番号: 28)

これらの合成 DNA を用いてラット視床下部 cDNA より PCR にて取得した。PCR の反応液はラット視床下部 cDNA 溶液 2  $\mu$ l (0.2 ng poly(A)<sup>+</sup>RNA 由来)、GHCF (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l、GHR (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l、酵素に添付の 10 x 反応液 5  $\mu$ l、dNTP (10mM) 5  $\mu$ l、KlenTaq (クローンテック社) 1  $\mu$ l、蒸留水 35  $\mu$ l を加えて合計 50  $\mu$ l にした。反応液を ThermalCycler9600 (パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社) を用いて PCR 反応にかけた。PCR の条件は 95  $^{\circ}$ C 2 分の変性の後、98  $^{\circ}$ C 10 秒、68  $^{\circ}$ C 90 秒のサイクルを 35 回繰り返した。PCR 産物の一部を用いて電気泳動で約 1.1 kb の PCR 産物の増幅を確認した後、PCR 産物を TA クローニングキット (Invitrogen 社) を用いて大腸菌にサブクローニングした。サブクローニングで得られた大腸菌からプラスミドをプラスミド抽出機 (クラボウ社) を用いて抽出し、挿入断片の塩基配列を決定し、その配列が上記の文献に報告されているものと同じ GHS 受容体 cDNA であることを確認した。次にそのプラスミドから制限酵素 Sal I および Nhe I によって消化後約 1.1 kb の GHS 受容体 cDNA 断片を得た。さらに、動物細胞用の発現ベクターである pAKKO-111H はマルチクローニングサイト部分の制限酵素サイト Sal I および Nhe I によって消化後、電気泳動を行い、ベクター部分を回収した。以上の操作によって調製したラット GHS 受容体 cDNA の断片および発現ベクターをライゲーションによって連結し、大腸菌 JM109 を形質転換して E. coli JM109 / pAKKOGHSR を得た。

形質転換体 E. coli JM109 / pAKKOGHSR を培養し、プラスミド pAKKOGHSR の DNA を大量に調製した。

そのプラスミドDNAのうちの20  $\mu$ gを1mlのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解後、ジーントランスファー (和光純薬) のバイアルに注入し、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌してDNAを含有するリポソームを形成させた。CHO dhfr<sup>-</sup>細胞1ないし $2 \times 10^6$ 個を直径35mmの細胞培養用シャーレに播種し、20時間培養した後に培養液を新鮮なものに交換した。各シャーレに対して0.5  $\mu$ gのDNAに相当する量 (25  $\mu$ l) のリポソーム液を滴下し、16時間インキュベーションを行ってプラスミドDNAの導入を行った。さらに新鮮な培地に交換して1日間培養した後、選択培地 (deoxyribonucleosidesおよびribonucleosidesを含有しないminimum essential medium, alpha mediumに10%透析ウシ血清を加えたもの) に交換して3日間培養を続け、最後にトリプシン消化を行って分散させた細胞を低密度で選択培地中に播種し、形質転換体の選択を行った。形質転換体のみが選択培地中で増殖することが可能であり、継代を繰り返すことによって選択を重ね、CHO-GHSR細胞を樹立した。

【0043】

## 実施例 2

GHS受容体発現CHO細胞を $2.7 \times 10^5$  cells/wellの密度でサイトセンサー用のカプセルに継代した後、一晚培養した。細胞をサイトセンサーに装着した後、0.1%のウシ血清アルブミンを含有するlow-buffered RPMI1640培地をサイトセンサーのポンプを用いて100  $\mu$ l/minで80秒間の送液と40秒間のポンプ停止のサイクルとして供給し、acidification rateの測定を行なった。acidification rateは各サイクルにおいてポンプ停止後8秒後から30秒間のpHの変化率として算出した。サイトセンサーの流路の切り換えによってサンプルを細胞に7分2秒間暴露し、acidification rateの変化を測定した。各ウェルの値を比較するため、サンプル投与前3サイクルのacidification rateの値を100%としてデータの標準化を行なった。acidification rateの値が安定した後、0.1mM~1  $\mu$ Mの高濃度のペプチドサンプルを細胞に暴露し、その反応の有無をサイトセンサーを用いて測定した (表1)、(表2)。また、GHS受容体を発現しないCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を用いても同様の方法で反応の有無をサイトセンサーを用いて測定した。反応のピーク時のacidification rateの値が120%を超えるものについては (○

）、120%以下であるが明らかに反応と認められるものについては（△）、反応が認められないものは（×）、どちらとも言えないものは（？）で表示した。また、表1、表2中、HwAwfKaは、His D-Trp Ala Trp D-Phe Lys-amideを示す。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

構造	名称	GHSR	CHO dhfr <sup>-</sup>
HwAwfKa (Bachem社製)	GHRP-6	○	×
FMRFa (配列番号: 1) (Bachem社製)		○	×
YFMRFa (配列番号: 2) (Bachem社製)		○	?
YGGFMRFa (配列番号: 3) (Bachem社製)		○	?
YGGFMRF (配列番号: 4) (Bachem社製)		×	×
PQRFa (配列番号: 5) (Bachem社製)		×	×
FLFQPQRFa (配列番号: 6) (Bachem社製)	F-8-F-NH <sub>2</sub>	○	×
AGEGLSSPFWSLAAPQRFa (配列番号: 7) (Bachem社製)	A-18-F-NH <sub>2</sub>	△	○
pEDPFLRFa (配列番号: 8) (Bachem社製)		×	×
DRNFLRFa (配列番号: 9) (Bachem社製)		○	×
NRNFLRFa (配列番号: 10) (Bachem社製)		○	×
TNRNFLRFa (配列番号: 11) (Bachem社製)		○	?
PDVDHVFLRFa (配列番号: 12) (Bachem社製)		×	×
KNEFIRFa (配列番号: 13) (Bachem社製)	AF-1	○	×
KHEYLRFa (配列番号: 14) (Bachem社製)	AF-2	?	×
LPLRFa (配列番号: 15) (ペプチド研製)		×	×
SRAHQHSMEIRTPDINPTWYTGRGIRPVGRFa (配列番号: 16) (PCT/JP96/03821号に記載)	bPrRP31	△	
TPDINPAWYAGRGIRPVGRFa (配列番号: 17) (PCT/JP96/03821号に記載)	rPrRP20	△	×
SPEIDPFVVYGRGVRPIGRFa (配列番号: 18) (M. Fujimoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 242: 436-440 1998年に記載)	cRFa	△	×
SGQSWRPQGRFa (配列番号: 19) (Bachem社製)	ACEP-1	△	×

【表 2】

LSSFVR1a (配列番号: 20) (Bachem社製)		△	×
ARPGYLAFFPRMa (配列番号: 21) (Bachem社製)	SCPA	×	×
MNYLAFFPRMa (配列番号: 22) (Bachem社製)	SCPB	×	×
YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRYa (配列番号: 23) (ペプチド研製)	neuropeptide Y	×	×
HKTDSFVGLMa (配列番号: 24) (ペプチド研製)	neurokinin A	×	×
pEPLPDCCRQKTCSCRLTELLHGAGNHAAGILTLa (配列番号: 25) (ペプチド研製)	orexin A	×	
RSGPPGLQGRLQRLLQASGNHAAGILTMa (配列番号: 26) (ペプチド研製)	orexin B	×	

【0045】

【発明の効果】

本発明の方法、即ちオーファン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分またはオーファン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分に発現したオーファン受容体タンパク質に試験化合物を接触させ、オーファン受容体タンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニストを選定した後、各アゴニストの構造を比較することによって、オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプ、アンタゴニスト・高活性アゴニストなどを効率的かつ確実に取得できる。

【0046】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method for Exploring a Ligand

<130> A99163

<160> 26

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 1

Phe Met Arg Phe

1 4

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 2

Tyr Phe Met Arg Phe

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 3

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Phe

1 5 7

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

Tyr Gly Gly Phe Met Arg Phe

1 5 7

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 5

Pro Gln Arg Phe

1 4

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 6

Phe Leu Phe Gln Pro Gln Arg Phe

1 5 8

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 7

Ala Gly Glu Gly Leu Ser Ser Pro Phe Trp Ser Leu Ala Ala Pro Gln

1

5

10

15

Arg Phe

18

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<233> Xaa means pGlu

<400> 8

Xaa Asp Pro Phe Leu Arg Phe

1

5

7

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 9

Asp Arg Asn Phe Leu Arg Phe

1

5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 10

Asn Arg Asn Phe Leu Arg Phe

1                      5              7

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 11

Thr Asn Arg Asn Phe Leu Arg Phe

1                      5              8

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 12

Pro Asp Val Asp His Val Phe Leu Arg Phe

1                      5                      10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 13

Lys Asn Glu Phe Ile Arg Phe

1                      5              7

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 14

Lys His Glu Tyr Leu Arg Phe

1                      5              7

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 15

Leu Pro Leu Arg Phe

1                      5

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 16

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1                      5                      10                      15  
Pro Thr Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe  
20                      25                      30 31

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 17

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro  
1                      5                      10                      15  
Val Gly Arg Phe

20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 18

Ser Pro Glu Ile Asp Pro Phe Trp Val Tyr Gly Arg Gly Val Arg Pro  
1                      5                      10                      15  
Ile Gly Arg Phe

20

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 19

Ser Gly Gln Ser Trp Arg Pro Gln Gly Arg Phe

1                      5                      10 11

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 20

Leu Ser Ser Phe Val Arg Ile

1                      5                      7

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 21

Ala Arg Pro Gly Tyr Leu Ala Phe Pro Arg Met

1                      5                      10 11

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 22

Met Asn Tyr Leu Ala Phe Pro Arg Met

1                      5                      9

<210> 23

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 23

Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp

1                      5                      10                      15

Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr

20                      25                      30

Arg Gln Arg Tyr

35 36

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 24

His Lys Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met

1                      5                      10

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form,

<233> Xaa means pGlu

<400> 25

Xaa Pro Leu Pro Asp Cys Cys Arg Gln Lys Thr Cys Ser Cys Arg Leu

1 5 10 15

Thr Glu Leu Leu His Gly Ala Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr

20 25 30

Leu

33

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 26

Arg Ser Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln

1 5 10 15

Ala Ser Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr Met

20 25

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 27

GTGACCATG TGGAACGCGA CCCCCAGCGA GGAG

34

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 28

GCTAGCGGAG AGATGGGATG TGCTGTCATG T

31

【書類名】要約書

【要約】

【課題】オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法の提供。

【解決手段】

(i) オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合と、オーファン受容体タンパク質を発現しない細胞またはその細胞膜画分に試験化合物を接触させた場合において、それぞれの細胞刺激活性を測定し、

(ii) 各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニスト活性を有する試験化合物の共通構造を決定し、

(iii) ① 該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該共通構造を有するリガンド候補物質を接触させた場合と該オーファン受容体タンパク質発現細胞またはその細胞膜画分に該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質を接触させた場合における細胞刺激活性を比較し、および ② 該オーファン受容体タンパク質と該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物の候補物質との特異的結合量を測定することを特徴とする該オーファン受容体タンパク質の機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法など。

【効果】本発明の方法、即ちオーファン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分またはオーファン受容体タンパク質発現細胞もしくはその細胞膜画分に発現したオーファン受容体タンパク質に試験化合物を接触させ、オーファン受容体タンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、各試験化合物の細胞刺激活性を比較することにより、アゴニストを選定した後、各アゴニストの構造を比較することによって、オーファン受容体タンパク質のリガンドまたはそのサブタイプ、アンタゴニスト・高活性アゴニストなどを効率的かつ確実に取得できる。

【選択図】なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**